云 南 植 物 研 究 6（3）：305—310，1984
Acta Botanica Yunnanica

云南山茶雄配子体发育过程中多糖、DNA及组蛋白的细胞化学定位*

刘成运
（中国科学院昆明植物研究所）

摘要 人工培养的云南山茶（*Camellia reticulata* Lindl.）花粉管发育的早期含有较丰富的可溶性多糖，特别是顶端生长区。胼胝质拴塞显示PAS阳性反应。当生殖细胞进入花粉管后，在较短的时间内接近营养核，并与其相贴合。然后才开始有丝分裂形成两个精细胞。生殖细胞核孚尔根染色反应要比营养核以及后来形成的两个精核的染色深，生殖细胞与营养核PAS反应均为阳性。用氨—银染色法测定组蛋白的细胞化学所见，生殖核显示出黄黑色的反应产物，而营养核则显示有很丰富的精氨酸组蛋白黑色反应产物。在精子形成之后，营养核染色质扩散，孚尔根染色及组蛋白染色均很弱，并经常位于两精子的附近。

云南山茶（*Camellia reticulata* Lindl.）雌雄配子体的发育已于前文报道[1]。花粉成熟以后，形成生殖细胞和营养核，并进入一较短期的休眠期。云南山茶原始品种云南红花油茶于11月起开花，比栽培品种要早二个月左右。本文应用人工培养花粉的方法，对云南红花油茶成熟花粉粒在形成两精子过程中，对花粒管及其中的营养核、生殖细胞以及由它进一步有丝分裂形成两精子的动态进行了多糖、DNA及组蛋白的组织化学定位观察，为深入研究山茶的个体发育提供参考。

材料和方法

实验用材料为云南红花油茶（*Camellia reticulata* Lindl. f. simlex Sealy），于1982—1983年采自本所植物园。在花蕾开放后，取尚未裂开的花药，在室内置洁净平皿内，待花药自然开裂。取花粉培养于含有100mg/L硝酸钾，200mg/L硫酸镁，300mg/L硝酸钙，0.001%硼酸，15%蔗糖以及0.8%琼脂的培养基中（Brewbaker and Kwack，1963），于22°C培养在温箱内。在不同间隔时间取样进行镜下观察并进行下述组化反应。

PAS及孚尔根核反应，样品固定于卡诺氏固定液（1：3）30分钟。对照用唾液5%三氯醋酸水解后同时进行染色。组蛋白染色用氨银（A-S）法，样品固定在10%中性福尔马林中不少于15钟，一般固定30分钟。A-S染色后，经3%福尔马林、水洗等再按常规方法脱水透明。对照用HONO处理，所有对照结果证实染色是正确的。

本文于1984年1月25日收到。
*本研究所用山茶材料由我所植物园夏丽芳同志赠送，特致感谢。

结 果 与 讨 论

花粉粒在人工培养基中22°C约2—3小时大部分开始萌发。当培养基蔗糖含量为10%时，花粉管生长迅速，但细长，多拴塞。特别是花粉管中部生殖细胞所在的区域呈现出扩张状态，同时由于花粉管细长，互相交织在一起，不利于进行组化反应及观察。改用15%蔗糖，花粉管则比较粗壮，顶端也不易爆裂。培养约10小时，大部分营养核及生殖细胞进入花粉管，20至24小时，大部分花粉管内出现有丝分裂或形成两个精子。24小时以后，花粉管顶端多爆裂。

1. PAS反应 花粉粒经培养后，凡有萌发力者均被锡夫试剂染成较深之玫瑰红色，而无萌发力者，只有纤维素性质的内壁和三个萌发孔被染成红色，其余部分很淡或无色（图版Ⅰ，1）。因此，花粉粒内所含多糖碳水化合物的多少与花粉粒的萌发是有关的。花粉粒萌发初期，花粒管内充满了浓稠的细胞质，PAS染色呈阳性反应，尤以顶端5—7微米范围内染色较深（图版Ⅰ，1）。但未观察到呈颗粉状的贮存形式，均为质地均匀的可溶性状态的多糖。这也反映了萌发的花粉管正处在生长能力旺盛、代谢异常活跃的时期。当花粒管进一步伸长，营养核首先进入花粉管，并且以较均匀的速度移动到花粒管的顶端区域，或距顶端约30微米的部位。其形状多为圆球形。在生殖细胞进入花粒管后，移动的速度比营养核快，其形状多为圆柱形或椭圆形。营养核和生殖细胞均可被PAS反应所染色，不同于有些作者在水车前（*Ottela alismoides* (L.) Pers.）花粒管中所观察到的生殖核的核仁为PAS反应阳性，而营养核为阴性反应[16]。整个花粉管多糖的分布特点是顶端丰富，近花粉粒的基端少或无（图版Ⅰ,2）。在未染色活体观察时，顶端被称作“Cap-block”[10]的部位通常呈无色透明状，而经PAS染色后，这一部分染色最深，说明这一生长旺盛的顶端生长区含有最多量的可溶性多糖。这一结果与已报道的其他植物花粉管顶端生长区多糖组化反应结果是一致的[3、17]。随着花粉管的进一步伸长，营养核和生殖细胞均移动到花粉管的顶端区域，这一区域细胞质也比较丰富，同时在这一部分与基端之间开始产生胼胝质拴塞，并且花粉管愈长，拴塞数目也愈多。培养在15%蔗糖的培养基中有1—3个拴塞形成，而在10%蔗糖的培养基中则可形成3—7个不等。在此时，近花粉粉一端花粉管内产生大的液泡，细胞质沿花粉管壁内侧分布，PAS染色极淡，逐渐向顶端过渡，染色的强度也逐渐地增加。通过一个近顶端的拴塞观察，可以发现，在近顶端的一侧，PAS染色较深，为匀质性的可溶性多糖成分，而近基端的一侧，整个花粉管内染色极淡，只有少数一些呈颗粒状的红色反应物，也许是小的淀粉颗粉（图版Ⅰ，3）。整个中部花粉管只有纤维素性质的管壁染色略深。一些文献中解释这些纤维素是被嵌埋在非晶体的多糖基质之中[17]。关于花粉管中胼胝质拴塞的性质，在不少文献中都曾给予阐述[3、9、10、14]。作者应用溴酚兰、溴甲酚绿等胼胝质染料[4]，对云南山茶花粉管中拴塞的形成也作了一些观察。经染色之后，胼胝质拴塞被染成鲜蓝色，并可清禁地观察到拴塞与花粒管内壁相连接，蓝色从拴塞一直向内壁伸延约10—20微米长。可知拴塞是由内壁起源的（图版Ⅰ，5）。早期形成的拴塞是一平坦的环状，沿内侧壁向中心逐渐地增厚，最后在中部合并，并逐渐形成圆球

状突起，伸向花粉管的两侧。经PAS染色，胼胝质拴塞亦被染成红色（图版Ⅰ，4）。这说明拴塞不仅含胼胝质也含多糖成分。而胼胝质与多糖一样都是一种碳水化合物，它不仅在植物维管系统的筛孔分子，而且也在其他类型的细胞中形成。这一结果与一些作者对兰科植物（*Calanthe veithii*, *Cypripedium insingne*）的花粉管内拴塞进行的果胶质组化染色试验的阳性结果有些类似[14]，因为果胶质也可被PAS反应染成红色。但另一些作者对棉花花粉管所进行的PAS染色却是无色的阴性结果[11]。对于拴塞的生理功能，通常认为起着阻止花粉管前端的细胞质及其中的内含物逆流，保证前端生长区充足的营养物质供应，以利于生殖细胞的有丝分裂。有些作者对（*Lilium auratum*）的花粉管通过活体材料观察，发现当花粉管中胼胝质拴塞形成后，被隔离的一部分细胞质仍然在继续独立地流动[10]。作者在对山茶花粉管进行ATP酶和酸性磷酸酶组化反应时，在个别的花粉管的拴塞中观察到有很少量的酶活性，这些酶的是拴塞形成过程中必须参与的，还是在拴塞形成之后，花粉粒中的一些可塑性生物活性物质仍然可以通过拴塞被输送到顶端生长区域所表现出的酶活性，目前尚无有关的实验来加以证实。但在这一时期花粉粒仍然有很强的ATP酶的活性，以及花粉管内细胞质膜上仍然存在明显的酶的活性，一直到精子形成后才消失。以上这些现象也许能反映拴塞并非一无生命活动的纯机械组织（待发表）。

2.孚尔根反应　云南山茶花粉粒和花粉管中只有营养核和生殖细胞核呈现孚尔根阳性反应，其余部位均为负反应。生殖核的染色深度明显地高于营养核以及后来由生殖细胞分裂所形成的两精子（图版Ⅰ；6—7；图版Ⅱ，11—12）。这一结果和生殖细胞核在进入有丝分裂前，在S期，特别是在G_2期核内DNA含量的加倍有关。DNA在G_2期C值由“C”增加为“2C”[2,16]。关于这方面的报道，在不同值物中都有相同的结果[16]。云南山茶花粉萌发后不久，营养核进入花粉管，随后生殖细胞进入，并以较快的速度接近营养核并与其相贴合。这一过程在人工培养的君子兰花粉管中曾被详细地研究过，该作者认为这一过程对生殖细胞分裂形成两个精子时物质的交换，特别是能量的供应起着很大的作用[5,6]。贴合后，生殖细胞与营养核分离，同时进入有丝分裂中期（图版Ⅰ，8—10）。从图版Ⅰ，8—10可观察到生殖细胞分裂中期，末期以及两精子形成的各时期。值得注意的是当生殖细胞开始有丝分裂后，营养核的核膜变得松散，染色质变为离散状态，同时核的体积扩大，孚尔根染色深度大大降低，呈现淡红色染色反应（图版Ⅰ，8—10；Ⅱ，11、21）。但营养核仍然紧靠在二个精细胞附近，以致在二个精子被从花粉管中挤压出来后，营养核仍留在它们附近。可见营养核在精子形成过程中，不仅提供物质和能量，也起着一定的保护作用。这一结果与在君子兰雄配子形成时所表现的情况是一致的[5,6]。两精子形成之后，大多呈长椭圆形，少数呈圆形，但从花粉管中移出后，很快地变成圆球形（图版Ⅰ，10；Ⅱ，11、12、19、20）。云南山茶在人工培养条件下，未观察到多形态精子，这与在油茶（*C. oleosa* R.）中所观察到的可产生多形态之精子的报道有所不同[7]。但是在自然条件下，特别是在晚期开花的花柱中，花粉管内会不会产生多形态的精子尚未进行这方面的调查。云南山茶精子形成时分裂方式也不一致，大多数情况下为与花粉管纵轴呈平行的纵分裂，但也有一些是与花粉管的纵轴呈垂直的横向分裂（图版Ⅰ，10，Ⅱ，11、19）。

3.组蛋白反应 组蛋蛋白是碱性蛋白质，是染色质蛋白质的主要成分，而组蛋白中又以赖氨酸和精氨酸二种碱性氨基酸的含量最高。通过氨-银染色，可以显示赖氨酸和精氨酸的相对含量和分布[8、16]。云南山茶营养核被A-S染色剂染成深黑色，这是精氨酸的反应产物，说明花粉管内营养核精氨酸的含量非常丰富。而生殖细胞被染成黄黑色而不是典型的黄色赖氨酸组蛋白终结产物[8、16]。造成染色过深的原因一方面可能是染色时间过久（只要求数秒钟）造成染色过深，另一方面也可能生殖细胞核同样含有精氨酸的成分。对照制片则不被染色。从图版Ⅱ，13—20这一组氨-银染色的图片，我们可以观察到生殖细胞与营养核贴合并分裂成两个精子的过程。两个精核染色要淡些，染色的深浅变化与孚尔根染色的变化是一致的。因为对每个细胞来说，在整个有丝分裂期，即M期，组蛋白与DNA的相对含量的比例实际上是保持不变的[2、16]。DNA和组蛋白在核内成为紧密的结合状态。在核内组蛋白的作用主要是帮助DNA的堆积，同时使DNA稳定，保护它不受到不恰当的降解或变性。另外组蛋白结合于DNA的外表可以防止遗传信息的表达，由于调节基因表达的机理，在任何给定的时间，大部分遗传信息的表达是被抑制的，而其余的表达则被诱发[12]。Santer (1971)报道了一个很高的DNA结合组蛋白的含量，这个DNA结合的组蛋白是生殖核内的赖氨酸。交织成环状的染色体纤丝的赖氨酸组蛋白与精氨酸比较，对于形成致密的不活动的染色体具有重要的意义，而营养核内的精氨酸组蛋白的高的含量，说明了它对RNA和蛋白质的合成有关[13、15、16]。

参 考 文 献

〔1〕刘成运、张香兰，1983：云南山茶雌雄配子体的发育。云南植物研究，5（4）：401—407。

〔2〕朱澂主编，1982：植物染色体及染色体技术。科学出版社，pp. 1—22。

〔3〕李正理著，1979：棉花形态学。科学出版社，pp. 120—127。

〔4〕郝秉中、吴继林，云翠英，1980：巴西橡胶树有输导功能的韧皮部与采胶的关系。植物学报，22（3）：227—231。

〔5〕唐佩华，1973：在人工培养条件下君子兰（*Clivia nobilis*）雄配子体发育过程中营养核与生殖细胞的动态——显微缩时电影记录与一般细胞学观察。植物学报，15（1）：12—18。

〔6〕唐佩华，1979：在人工培养条件下君子兰（*Clivia nobilis*）等雄配子体发育过程中营养核与生殖细胞的动态Ⅱ．三磷酸腺苷酶的细胞化学观察。植物学报，21（2）：107—116。

〔7〕曹慧娟，1965：油茶胚胎学的观察。植物学报，13（1）：44—60。

〔8〕Black, M. M., H. R. Ansley, 1964: Histone staining with ammoniacal silver. *Science* 143(3607): 693—695.

〔9〕Esaw, K., 1977: Plant anatomy（李正理译1979）。科学技术出版社出版，pp. 287。

〔10〕Iwanami, Y., 1965: Protoplasmic movement in pollen grains and tubes. *Phytomorphology* 6(3,4): 288—295.

〔11〕Jensen, W. A. and D. B. Fisher, 1970: Cotton embryogensis: The pollen tube in the sligma and style. *Protoplasma* 69: 215—235.

〔12〕Langan, T. A., 1968: Histone phosphorglation; stimulation by aclenosine 3,5—monophosphate. *Science* 162: 579—580.

〔13〕Olszewska, M. J. and K. Marciniak, 1977: The role of histones in the restriction of chromatin activity in successive stages of development of the antheridial filaments *Chara* [*valgavis L.*, *Folia Histo.Cyto.* 15: 109.

〔14〕 Poadubnaya V. A-Arnoldi, 1960: Study of fertilization in the living material of some angio sperms. *Phytomorphology* 10 (2): 185—198.
〔15〕 Santer, J. J., 1971: Histones, RNA and protein synthesis in pollen cells of Paeonia; in pollen development and physiology. J. Heslop-Harrison London. Butter-worths pp: 36.
〔16〕 Shah, C. K., and B. J. Apparao, 1982: Cytochemical study of male gametophyte in *Ottelia alismoides* Pers. *Proc Indiao Sci. Acad.* B48 (2): 251—254.
〔17〕 Swamy, B. G. L., and K. V. Krishnamurthy, 1980: From flower to fruit: embryology of flowering plants. Tata McGraw-Hill Publishing Co., Limited New Delhi pp: 51—57.

CXTOCHEMICAL LOCALIZATION OF POLYSACCHARIDE, DEOXYRIBONUCLEIC ACID AND HISTON WITHIN DEVELOPING MALE GAMETOPHYTE OF CAMELLIA RETICULATA

Liu Chengyun
(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract

The pollen tubes grown in vitro were rich in soluble polysaccharide, particularly in the top growth region at the initial stage of pollen tube develo-pment. The callos pluge gave a positive reaction to PAS. After entering the pollen tube, the generative cell approached the vegetative nucleus before long and sticked each other. Then, two sperms formed via mitosis division. The intensity of colour in generative nucleus by using Feulgen reaction was deeper than vege-tative nucleus and two sperms forming later. The generative cell and vegetative nucleus gave a positive reaction to PAS stain. As ammoniacal silver nitrite was used, the generative nucleus appeared yellow-black colour while vegetative nucleus gave a black reaction product. It suggested the existence of arginine-rich histone. After the formation of two sperms, the chromation of vegatative nucleus turned to diffusible and the vegtative nucleus made a very feeble response to the Feulgen reaction and A-S staining. The vegetative nucleus was often in close proxity to the sperms.

Explanation of Plates

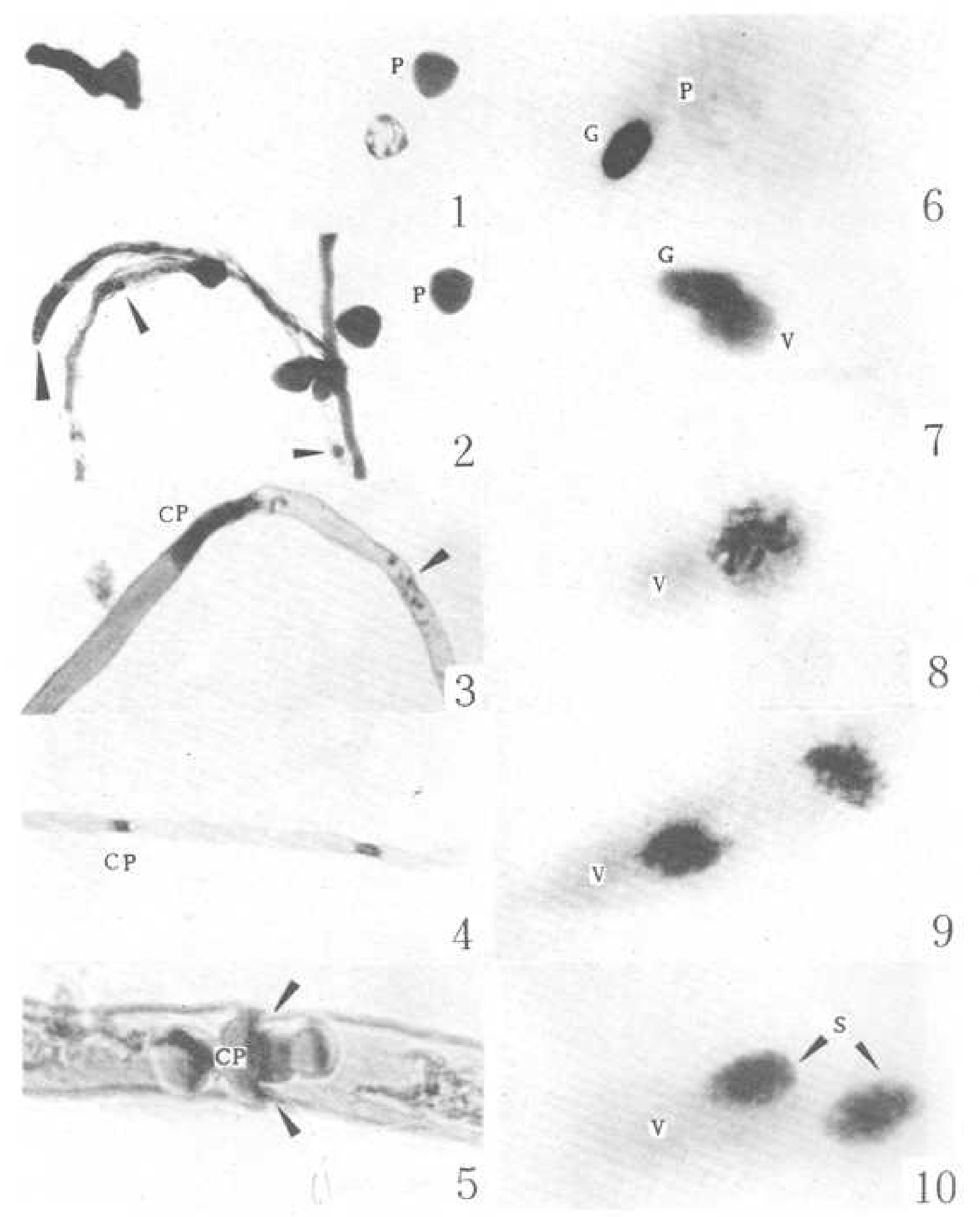
Legends: P-Pollen grain, CP-Callose plug, G-Generative cell, V-Vegetative nucleus, S-Sperm, T-Pollen tube.

Plate I

1—4 PAS staining; 5-Bromophenol blue staining; 6—10 Feulgen staining. 1. PAS staining in the pollen grain and germinative tube at the initial stage×200. 2. Showing rich polysaeeha-ride in the tube top and so has nucleus, but the base of tube is the least×200. 3. The callose plug gave a positive reaction to PAS stain×600. 4. Middle of a pollen tube, shown two callose plugs×200. 5. A callose plug showing arise from intine×1700, 6. Showing the colour in generative nucleus by using Feulgen reaction is the deepst×1800. 7. Sticking of generative cell and vegetative nucleus closely to each other×3600. 8. The metaphase of mitosis×3600. 9. The telophase of mitosis×4500. 10. Two sperms has formed, in Fig. 8—10 the vegetative nucleus stainig are all blurred×4500.

Plate Ⅱ

11—12 Feulgen staining; 13—20 Ammoniacal silver(AS)) staining. 11. The comparison of two sperm generative nucleus and vegetative nucleus×1800. 12. Two sperms outside the pollen tube×3600. 13. A pollen grain using A-S staining×360. 14. A germinative pollen grain at the initial stage×1800. 15. The generative cell approached the vegetative nucleus×2700. 16—18. Sticking of generative cell and vegetative nucleus closely to each other×1120; ×3150; ×3150. 19. Two sperms formation at the inittal stage×3150. 20. Two sperms outside the tube, the vegetative nucleus is often in close proximity to the sperms×3150.

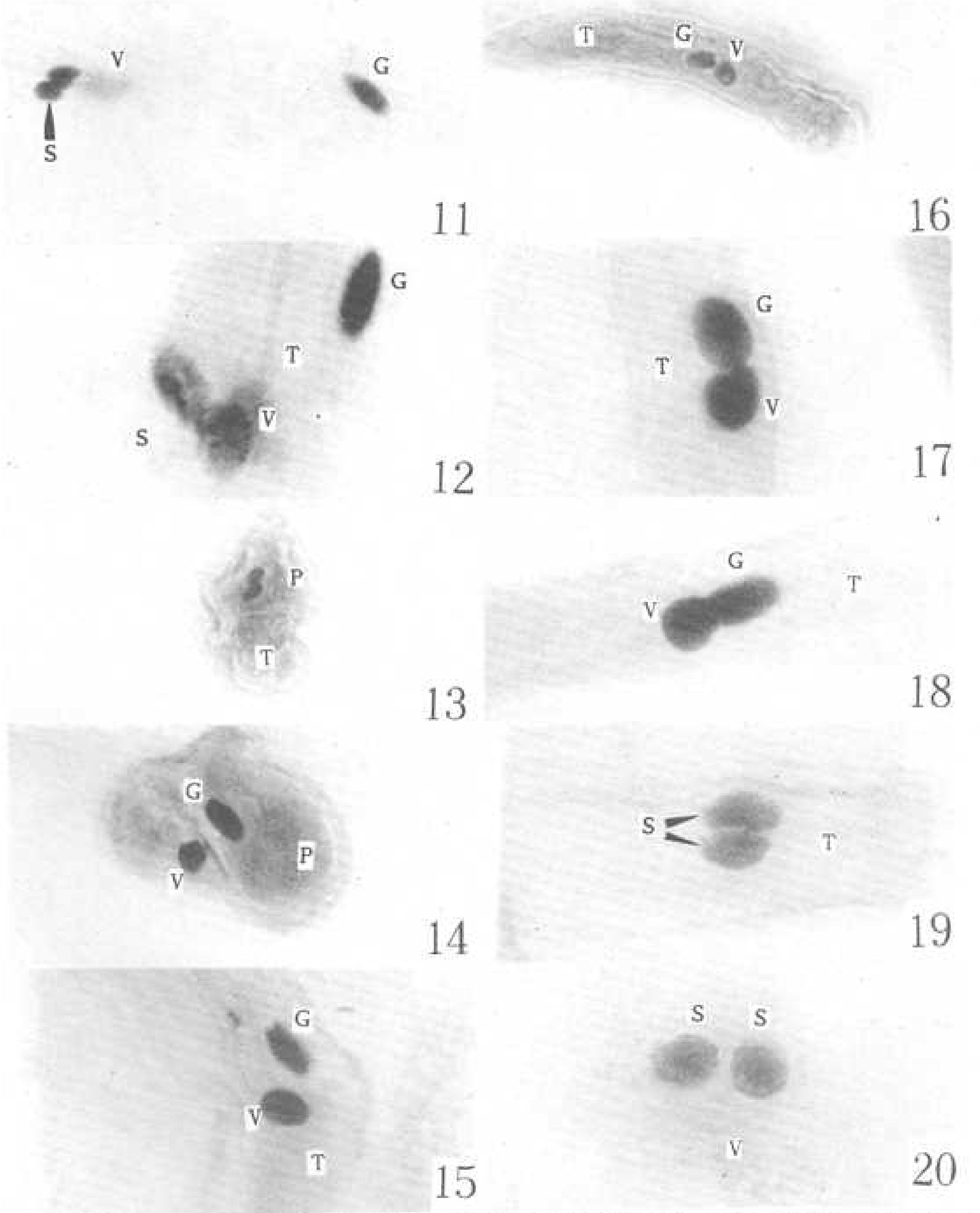


代号：P—花粉粒，CP—胼胝质拴塞，G—生殖细胞，V—营养核，S—精子，T—花粉管。

1—4 PAS染色； 5—溴酚兰染色； 6—10 孚尔根染色。 1.萌发初期，花粉粒及花粉管内PAS染色。×200 2.花粉管顶端含丰富的多糖，核内亦有，而基部很少。×200 3.胼胝质拴塞PAS反应阳性。×600 4.花粉管中部两个拴塞。×200 5.示拴塞是由内部起源（箭头）。×1700 6.一个生殖细胞，核呈孚尔根强阳性。×1800 7.生殖细胞与营养核贴合。×3600 8.有丝分裂中期。×3600 9.有丝分裂末期。×4500 10.两精子已形成，图8—10中营养核染色均模糊。×4500

刘成运：云南山茶雄配子体发育过程中多糖、DNA及组蛋白的细胞化学定位　　图版 II

Liu Chengyun: Cytochemical Localization of Polysaccharide Deoxyribonucleic Acid and Histon within Developing Male Gametophyte of *Camellia reticulata* Lindl. Plate II



11—12 孚尔根染色；13—20 A—S 染色。 11.两个精子、生殖细胞与营养核染色之比较。×1800 12.花粉管外两个精子。×3600 13.一个A—S 染色之花粉粒。×360 14.萌发初期之花粉粒。×1800 15.生殖细胞靠近营养核。×2700 16—18.生殖细胞与营养核粘合。×3150 19.形成初期的两个精子。×3150 20.在花粉管外两个精子，营养核位于附近。×3150